

#33

AE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-151398

(43)Date of publication of application : 11.06.1996

(51)Int. Cl.

C07K 14/505

A61K 38/22

C07H 21/04

C12N 5/10

C12N 15/09

C12P 21/02

/(C12N 5/10

C12R 1:91)

(C12P 21/02

C12R 1:91)

(21)Application number : 07-057432 (71)Applicant : AMGEN

(22)Date of filing : 16.03.1995 (72)Inventor : STRICKLAND
THOMAS WAYNE
BYRNE THOMAS
EDWARD
ELLIOTT STEVEN
GEORGE

(30)Priority

Best Available Copy

Priority 89 421444 Priority 13.10.1989 Priority US
number : date : country :

(54) HUMAN ERYTHROPOIETIN ISOFORM

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new isoform having a change to cause an increase in a number of glycosylation sites in an amino acid sequence of human erythropoietin, capable of increasing the production of reticulocyte and erythrocyte, effective for treating anemia of renal failure, etc.

CONSTITUTION: This human erythropoietin isoform has one or more changes to cause an increase in a number of glycosylated sites such as N-bond carbohydrate chain bond site, an O-bond carbohydrate chain bond or the like by addition, deletion, substitution, etc., of an amino acid residue in an amino acid sequence of human erythropoietin, has activity on the increase of the production of reticulocyte and erythrocyte in vivo and is effective for treating anemia caused by chronic renal failure, etc. The isoform is obtained by varying one or more sites of sites 68, 69, 71, 124, 125, etc., of human erythropoietin gene by site specific variation, incorporating the gene to a vector, transferring the gene to a host cell such as Chinese hamster ovary egg cell, etc., to express the gene.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.04.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 14.04.1998

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3073905

[Date of registration] 02.06.2000
[Number of appeal against
examiner's decision of rejection] 10-10817
[Date of requesting appeal 13.07.1998
against examiner's decision of
rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998, 2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-151398

(43) 公開日 平成8年(1996)6月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/505		8318-4H		
A 6 1 K 38/22	ABY			
C 0 7 H 21/04	B			
		7729-4B	A 6 1 K 37/ 24	ABY
			C 1 2 N 5/ 00	B

審査請求 有 請求項の数15 OL (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-57432
 (62) 分割の表示 特願平2-514568の分割
 (22) 出願日 平成2年(1990)10月9日

(31) 優先権主張番号 4 2 1 4 4 4
 (32) 優先日 1989年10月13日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390035611
 アムジエン・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320
 -1789、サウザンド・オークス、デハビル
 ランド・ドライブ・1840
 (72) 発明者 トーマス・ウエイン・ストリツ克蘭ド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・93021、
 ムーアパーク、イースト・シダーパイン・
 13450
 (72) 発明者 トーマス・エドワード・バーン
 アメリカ合衆国、メリーランド・20817、
 ベセダ、サバンナ・ドライブ・7718
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトエリスロポエチン類似体

(57) 【要約】

【構成】 この発明は、特に、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列中に、グリコシル化部位の数の増加を生起させる1つ以上の変更をもつヒトエリスロポエチン類似体、及びヒトエリスロポエチンよりも炭水化物鎖の数が多いヒトエリスロポエチン類似体に関する。

【効果】 このヒトエリスロポエチン類似体は、網状赤血球及び赤血球のinvivo産生を増加させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列中に、グリコシル化部位の数の増加を生起させる1つ以上の変更をもつヒトエリスロポエチン類似体。

【請求項2】 前記部位がN-結合炭水化物鎖結合部位である請求項1記載の類似体。

【請求項3】 前記部位がO-結合炭水化物鎖結合部位である請求項1記載の類似体。

【請求項4】 前記アミノ酸配列中の変更が、アミノ酸残基の付加、欠失又は置換である請求項1記載の類似体。

【請求項5】 前記部位が、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列の位置69で置換されたものである請求項2記載の類似体。

【請求項6】 前記部位が、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列の位置125で置換されたものである請求項3記載の類似体。

【請求項7】 ヒトエリスロポエチンよりも炭水化物鎖の数が多いヒトエリスロポエチン類似体。

【請求項8】 前記炭水化物鎖がシアル酸結合部位を提供する請求項7記載の類似体。

【請求項9】 前記炭水化物鎖がN-結合炭水化物鎖である請求項7記載の類似体。

【請求項10】 前記炭水化物鎖がO-結合炭水化物鎖である請求項7記載の類似体。

【請求項11】 外来性DNA配列の発現産物である請求項1又は7に記載の類似体。

【請求項12】 下記の群：

[Asn⁶⁹]EPO、

[Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO、

[Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO、

[Thr¹²⁵]EPO、及び

[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO

から選択されるヒトエリスロポエチン類似体。

【請求項13】 請求項1、7又は12のヒトエリスロポエチン類似体をコードするDNA配列。

【請求項14】 宿主細胞がヒトエリスロポエチン類似体の発現を可能にするように請求項13記載のDNA配列でトランスフェクトされた真核宿主細胞。

【請求項15】 請求項1、7又は12に記載の治療上有効量のエリスロポエチン類似体と、医薬上許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含有してなる組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒトエリスロポエチン類似体、それをコードするDNA配列、そのDNA配列でトランスフェクトされた真核宿主細胞、及びそのような類似体を含む医薬用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】エリ

スロポエチンは、赤血球前駆細胞から赤血球への成熟過程に係わる糖蛋白ホルモンである。これは、循環赤血球のレベルの調節に必須である。自然界に存在するエリスロポエチンは胎児期の肝臓及び成人の腎臓により生産され、血液中を循環して骨髓に於る赤血球生産を刺激する。腎不全の結果、腎臓のエリスロポエチン生産の減少によりほとんど常に貧血になる。エリスロポエチンをコードした遺伝子で形質転換した宿主細胞の蛋白質生成物の発現を含む遺伝子工学技術により生産された組み換えエリスロポエチンは、慢性腎不全の結果起こる貧血の治療に用いる場合効果的であることが見いだされている。

【0003】近年までエリスロポエチンの入手は非常に限定されていた。この蛋白質は、ヒトの尿に存在するが、排出量が非常に少ないことからこれを実質的な治療用エリスロポエチン源とすることはできない。再生不良性貧血患者は、健康人と比較して高水準の尿中エリスロポエチン量を示すが、この尿の供給が限定されていることから、やはり実質的にかかる源とすることはできない。J. Biol. Chem., 252, 5558 (1977年) に於て、Miyake等によりヒト尿性エリスロポエチンの精製が、再生不良性貧血患者由来の尿を出発物質として用いて行われた。

【0004】エリスロポエチンをコードした遺伝子の同定、クローニング及び発現は、米国特許第4,703,008号(Lin)に記載されている。例えば、組み換えエリスロポエチンプラスミドを含む哺乳動物細胞の成長を支持した細胞培地からの組み換えエリスロポエチンの分離精製についての記載は、米国特許第4,667,016号(Lai等)に含まれる。組み換えプラスミド上にエリスロポエチン遺伝子を含む哺乳動物宿主細胞に於る、生物学的に活性な組み換えエリスロポエチンの発現及び回収は、初めて治療に十分な量のエリスロポエチンを使用可能にした。更に、遺伝子配列の知識及び、より大量の精製された蛋白質の使用可能性は、この蛋白質の作用様式についての理解を深めた。

【0005】蛋白質の生物学的活性は、その構造による。詳しくは、蛋白質の一次構造（即ち、そのアミノ酸配列）は、合成中及び合成後のポリペプチドによる二次（例えばアルファヘリックス又はベータシート）及び三次（三次折りたたみ構造全体）構造形成の情報を提供する。突然変異の誘導又は化学もしくは酵素処理による適切な二次及び三次構造の破壊は、生物学的活性の減少をもたらす。

【0006】原核生物に於て、蛋白質の生物学的活性は、前述の構造により大きく支配される。原核細胞からの蛋白質と異なって、真核細胞により生成される多数の細胞表面及び分泌蛋白質は、一又はそれ以上のオリゴサッカリド残基によって修飾されている。この修飾は、グリコシレーションと称し、蛋白質の物理特性に劇的に影響し、蛋白質の安定性、分泌及び細胞下局在性に於ても重要である。適切なグリコシレーションは、生物学的活

3

性に必須である。事実、真核生物由来の遺伝子が、細胞内蛋白質グリコシレーションプロセスを欠いたバクテリア（例えば大腸菌）に於て発現した場合、グリコシレーションの欠乏により活性がないか又はほとんどない蛋白質を生じる。

【0007】グリコシレーションは、ポリペプチド骨格の特定の位置で起き、通常二つの型、即ち、O-結合オリゴサッカリドがセリン又はスレオニン残基と結合する型とN-結合オリゴサッカリドが、配列Asn-X-Ser/Thr（ここでXはプロリンを除くアミノ酸を表す）の一部であるアスパラギン残基と結合する型がある。各型に於て見いだされたN-結合及びO-結合オリゴサッカリドの構造及び糖残基は、異なっている。通常両者に見いだされる糖の一種は、N-アセチルノイラミン酸（以下、シアル酸と称する）である。シアル酸は、通常N-結合及びO-結合オリゴサッカリド両者の末端残基であり、その負の電荷により糖蛋白質に酸の特性を与えることができる。

【0008】ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列1-165を有する組み換えエリスロポエチン（哺乳動物細胞内で発現）及びヒト尿由来のエリスロポエチンの両者は、糖蛋白質の全分子量の約40%から成る三ヶ所のN-結合及び一ヶ所のO-結合オリゴサッカリド鎖を含む。N-結合グリコシレーションは24、38及び83の位置に存在するアスパラギン残基で起こり、一方O-結合グリコシレーションは126の位置に存在するセリン残基で起こる（Lai等 J. Biol. Chem. 261, 3116 (1986年) ; Broudy等 Arch. Biochem. Biophys. 265, 329 (1988年)）。オリゴサッカリド鎖は、末端シアル酸残基で修飾されていることが示されている。全シアル酸残基を除去するためのグリコシル化エリスロポエチンの酵素処理は、インビトロ活性の損失を結果として生じさせるが、インビトロ活性には影響しない（Lowy等 Nature 185, 102 (1960年) ; Goldwasser等 J. Biol. Chem. 249, 4202 (1974年)）。この性質は、肝アシアログリコプロテイン結合蛋白質との相互作用により循環系からアシアロエリスロポエチンが速やかに除去されることにより説明される（Morrell等 J. Biol. Chem. 243, 155 (1968年) ; Briggs等, Am. J. Physiol. 227, 1385 (1974年) ; Ashwell等 Methods Enzymol. 50, 287 (1978年)）。このように、エリスロポエチンはシアル化され、肝結合蛋白質による結合を避けた場合のみインビトロ生物学的活性を有する。エリスロポエチンのオリゴサッカリド鎖に於る他の成分の役割は明らかではない。非グリコシル化エリスロポエチンは、グリコシル化型に比較してインビトロ活性が非常に減少するが、インビトロ活性は保持することが示されてきた（Dordal等 Endocrinology 116, 2293 (1985年) ; 前記Lin特許）。だが、他方の研究によると、グリコシレーション部位に存在するアスパラギン又はセリン残基の突然変異によるN-結合又はO-結合オリゴサッカリド鎖の単一又は同時除去は、哺乳動物細胞に於て生産される変化した

4

エリスロポエチンのインビトロ活性を著しく減少させる（Dube等 J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988年)）。

【0009】エリスロポエチンの如き糖蛋白質は、等電点電気泳動（IEF）の如き技術を用いて異なった荷電体に分離させることができる。多数の研究者達が、未精製及び部分精製したエリスロポエチン調製物のIEF研究について報告している（Lukowsky等 ; J. Biochem 50, 909 (1972年) ; Shelton等 Biochem. Med. 12, 45 (1975年) ; Fuhr等 Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 930 (1981年)）。エリスロポエチン活性を有する多くて3又は4個のフラクションがこれらの研究のIEFにより分類されたが、いずれも炭水化物含有量に関しては特徴づけられていない。さらに、フラクションの等電点とその生物学的活性との間には何ら関連付けがなされなかった。

【0010】前述のMiyake等により研究されたヒト尿由来の尿性エリスロポエチンの精製中、II及びIIIAと命名されたヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーの二個のエリスロポエチンフラクションは、同じ比活性を有することが報告された。後のフラクションII及びIIIAの炭水化物分析は、フラクションIIが、フラクションIIIAより平均シアル酸含有量が多いことを示した（前述のDordal等）。

【0011】

【課題を解決するための手段】

発明の概要

本発明は、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列中に、グリコシル化部位の数の増加を生起させる1つ以上の変更をもつヒトエリスロポエチン類似体を提供する。

【0012】このグリコシル化部位は、N-結合炭水化物鎖結合部位であってもよく、またO-結合炭水化物鎖結合部位であってもよい。また、このような変更は、例えばアミノ酸残基の付加、欠失又は置換によって行い得る。本発明の実施態様により、前記グリコシル化部位は、好適には、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列の位置69又は位置125で置換されたものである。

【0013】本発明はまた、ヒトエリスロポエチンよりも炭水化物鎖の数が多いヒトエリスロポエチン類似体を提供する。

【0014】炭水化物鎖は、シアル酸結合部位を提供するものであり得る。また、これはN-結合炭水化物鎖又はO-結合炭水化物鎖であってもよい。

【0015】具体的には、ヒトエリスロポエチン類似体として、[Asn⁶⁹]EPO、[Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO、[Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO、[Ser⁶⁹, Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO、[Thr¹²⁵]EPO、及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPOが例として挙げられる。

【0016】本発明はさらに、上記定義の治療上有効量のヒトエリスロポエチン類似体と、医薬上許容可能な希釈剤、アジュバント及び/又は担体とを含有してなる医薬組成物も提供する。

5

【0017】ヒトエリスロポエチン類似体は、網状赤血球、赤血球の産生を増加させる薬理効果を有する。

【0018】本発明はまた、上述したヒトエリスロポエチン類似体をコードするDNA配列をも提供する。さらに、本発明は、宿主細胞がヒトエリスロポエチン類似体の発現を可能にするように前記DNA配列でトランスフェクトされた真核宿主細胞も提供する。

【0019】詳細な説明

本発明によれば、エリスロポエチンイソフォームが提供される。等電点電気泳動(IEF)は、電荷に基づいて蛋白質を分離する。pH勾配及び電場供した場合、蛋白質は実効電荷を持たない位置に移動しそこにとどまる。これが、蛋白質の等電点(pI)である。IEF上に観察されるそれぞれ明確なバンドは、特定のpI、従って同じ全電荷を有する分子を表し、これをイソフォームと称する。ここで使用する用語「エリスロポエチンイソフォーム」とは、単一のpI及び同じアミノ酸配列を有するエリスロポエチン調製物を指す。

【0020】好ましい態様に於るエリスロポエチンは、非ヒト真核性宿主細胞の中にトランスフェクトされた外来性DNA配列の発現の生成物である。即ち、好ましい態様に於るエリスロポエチンは、組み換えエリスロポエチンである。組み換えエリスロポエチンは、参照により本明細書に含めた共通所有のLin 米国特許第4,703,008号に記載の手法により有利に生産される。組み換えエリスロポエチンは、参照により本明細書に含めた共通所有のLai 等の米国特許第4,667,016号の実施例2に記載の通常的手法、又はDEAE-アガロスクロマトグラフィーをQ-セファロースクロマトグラフィーに代えることを除いては実施例2に記載の手法により有利に精製される。Q-セファロースカラム変法に於て、カラムを中性のpHにするために用いる緩衝液において25mM NaCl から55mM NaCl に代え、カラムからエリスロポエチンを溶出させるために用いる緩衝液において75mM NaCl から140 mM NaCl に代える。この物質は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析すると、単一種(即ち、バンド)として移動する。精製エリスロポエチンをIEFに供すると、糖蛋白質の異なる電荷型が存在することを示す複数のバンドが現れる。

【0021】尿由来のヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列を有する組み換えエリスロポエチンの別々のイソフォームは、1から14のシアル酸を有するエリスロポエチン分子に対応し、精製した組み換えエリスロポエチンに存在する各イソフォームは、イソフォームが所有するシアル酸の数に従ったインビボ活性を有することを見いだした。ここで使用した用語「エリスロポエチン」とは、天然に存在するエリスロポエチン、即ち尿由来のヒトエリスロポエチン、及び骨髓細胞に網状赤血球及び赤血球の生産を増加させるインビボの生物学的特質を有するものに十分に、天然に存在するエリスロポエチンのアミノ酸

6

配列及びグリコシレーションに類似する天然に存在しないポリペプチドを含むものとする。

【0022】エリスロポエチンの粗調製物は、多数のイソフォームを有するが、例えば前述のLai 等の特許の実施例2のように精製した物質は、IEFにより分析した場合主に6個のイソフォームを含む。さらに、実施例4に記載のクロマトグラフィーの手法を用いて、少なくとも1個の他の高酸度イソフォームが検出されている。(IEFゲル上でシアル酸14個以上の位置に移動するこの高酸性型は、シアリダーゼ消化に対する電荷の抵抗性により示されるようにシアル酸の他の負の電荷を含むことができる)。これらのイソフォームは、シアル酸含有量により相互に異なる。実施例に示すように、これは、調製用IEFによりイソフォームの10個を分離し、そのうち5個についてシアル酸含有量を決定することにより証明される。シアル酸含有量を分析したイソフォームについて、5個のイソフォームは9,10,11,12又は13個のシアル酸残基のいずれかを含むことを見いだした。

【0023】イソフォーム5から11(ここで、各イソフォームはエリスロポエチン分子当りのシアル酸の数により命名した)のエリスロポエチン分子当りのシアル酸残基の数と、エリスロポエチンの相対インビボ比活性の間には相関関係がある。イソフォーム11から14は、ほぼ同じ相対インビボ比活性を有する。イソフォーム5から14は、低酸素赤血球増加症マウスバイオアッセイ法によりインビボ活性を分析し、存在する各イソフォームの量は、ブラッドフォード蛋白質分析、280nmに於る吸収又はエリスロポエチンに対するラジオイムノアッセイ(RIA)により決定した。U/mlとして表されるRIA測定値(Egrie等 Immunobiology 172, 213, (1986年)は、212, 770 U/mgエリスロポエチンポリペプチド(RIAにより決定された精製エリスロポエチンの平均比活性)で除することによってmgエリスロポエチンポリペプチド/mlとして表される単離したイソフォーム又はイソフォーム混合物の蛋白質濃度を与える。実施例に示すように、相対インビボ比活性はイソフォーム5からイソフォーム11まで段階的に増加している(表2参照)。

【0024】ここで言うインビボ比活性とは、相対インビボ比活性の測定値をいい、絶対インビボ比活性の測定値ではない。この出願の目的として、比活性は、同じ分析法、同じ内部標準を含む同じ条件、同じ型の動物、比活性を計算するために使用する同じ分析データ、蛋白質含有量を決定するための同じ分析法を用いて分析したイソフォームの相対活性を比較するためにのみ使用する。イソフォームについて報告されるインビボ比活性はどれも、そのイソフォームの個有値又は絶対値を表すものではない。

【0025】本発明は、エリスロポエチンイソフォームを提供する。本発明により得られるエリスロポエチンの特定のイソフォーム及びその性質は、出発物質の源によ

り変化する。例えば、尿由来のヒトエリスロポエチンのイソフォームは、組み換えエリスロポエチンのイソフォームと異なる。本発明は、好ましい態様に於て、エリスロポエチン分子当り特定の数（即ち、0より大きい一定の数）のシアル酸（当該数は1-14から成る群から選択される）を有するエリスロポエチンイソフォームに関する。有利な当該数は、9, 10, 11, 12, 13 又は14である。他の態様に於て、当該数は14を超え、有利には16-23 である。

【0026】本発明は、2種又はそれ以上のエリスロポエチンイソフォームを含む組成物を提供する。一つの態様に於て、この組成物は、エリスロポエチン分子当り所定数以上のシアル酸、例えばエリスロポエチン分子当り11個を超えるシアル酸又は分子当り12個を超えるシアル酸を有するイソフォームの混合物、例えばイソフォーム12, 13 及び14の混合物を含む。他の態様に於て、この組成物は、エリスロポエチン分子当り所定の数のシアル酸、例えば分子当り12個未満であるが 8個を超えるシアル酸を有するイソフォームの混合物、例えばイソフォーム9, 10及び11の混合物を含む。本発明はまたイソフォームの相対量が同じ又は異なるエリスロポエチンイソフォームの組成物を提供する。例えば、イソフォーム9, 10及び11の混合物は、1:1:1, 2:3:1又は20:20:1 のように割合を変えることができる。

【0027】この組成物は、4種未満のイソフォームの混合物、例えばイソフォーム11, 12及び13の混合物又は12及び14の混合物又は7 及び13の混合物を含むことが有利である。

【0028】エリスロポエチンイソフォームの混合物を製造するために、本発明は、選択するエリスロポエチンイソフォームを同時に単離する方法も提供する。これらの方法は、調製用等電点電気泳動のような技法による個々のイソフォームの単離、又はイオン交換クロマトグラフィー又は等電点クロマトグラフィーのような技法による分子当り所定数のシアル酸（例えば11超）を有するイソフォーム混合物の調製を含む。これらの全ての技法は、その基本として電荷による蛋白質の分離を有する。

【0029】通常、イオン交換クロマトグラフィー及び等電点クロマトグラフィーは、一部又は全部のエリスロポエチンイソフォームの樹脂への結合を可能にする条件下で、粗ヒトエリスロポエチン（細胞ならし培地）又は精製した物質のいずれかを樹脂のカラムにかけることを含む。粗エリスロポエチン調製物については、約pH7でこの蛋白質をカラムに供することが好ましく、精製した調製物については、pH7から約pH4でこの蛋白質をカラムに供することができる。約pH4の緩衝液でカラムを洗浄した後、イオン交換カラムに結合しとどまったこれらのエリスロポエチンイソフォームを、緩衝液の塩濃度及びpHを増加させることにより又は約pH4でイオン強度増加及びpH減少勾配に供することにより溶出させる。等電

点クロマトグラフィーではpH減少勾配又は高塩濃度でカラムを洗浄することによりカラムからイソフォームを溶出させる。

【0030】本発明の一つの態様は、分子当り所定数以上、例えば10超のシアル酸を有するエリスロポエチンイソフォームを選択的に合成する哺乳動物（例えばチャイニーズハムスター卵巣卵、CHO）宿主細胞に関する。エリスロポエチン分子は、分子のシアル酸含有量を制限することのできるN-結合又はO-結合オリゴサッカリド構造を有する。例えばテトラアンテナ（四分枝）N-結合オリゴサッカリドは、最も普通に4ヶ所のシアル酸結合可能部位を提供し、一方、アスパラギン結合部位に於てテトラアンテナ型と置換することができる二分枝及び三分枝オリゴサッカリド鎖は、通常、多くて2又は3ヶ所のシアル酸結合部位を有する。O-結合オリゴサッカリドは、通常2ヶ所のシアル酸結合部位を提供する。このように、エリスロポエチン分子は、3個のN-結合オリゴサッカリドが全てテトラアンテナである場合、シアル酸残基計14個を有することができる。組み換えエリスロポエチンにテトラアンテナ鎖を選択的に付加することができ、それによってシアル酸結合部位の数を最大限にすることができる細胞を得るために哺乳動物培養細胞を選抜する。

【0031】尿性エリスロポエチンのN-結合オリゴサッカリドは、ガラクトースに $\alpha 2, 3$ 及び $\alpha 2, 6$ 結合両者のシアル酸を含む（Takeuchi等 J. Biol. Chem. 263, 365 7(1988年)）。典型的には、 $\alpha 2, 3$ 結合のシアル酸はマンノース $\alpha 1, 6$ 分枝上のガラクトースに付加し、 $\alpha 2, 6$ 結合のシアル酸はマンノース $\alpha 1, 3$ 分枝上のガラクトースに付加する。これらのシアル酸を付加する酵素（ β -ガラクトシド $\alpha 2, 3$ シアリルトランスフェラーゼ及び β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ シアリルトランスフェラーゼ）は、それぞれマンノース $\alpha 1, 6$ 及びマンノース $\alpha 1, 3$ 分枝にシアル酸を付加させるのに最も効果的である。

【0032】ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）欠損チャイニーズハムスター卵巣卵（CHO）細胞は、組み換えエリスロポエチンを含む組み換え糖蛋白質の生産に通常宿主細胞として用いられる。これらの細胞は、酵素 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ シアリルトランスフェラーゼを発現しないことから、これらの細胞内で生産される糖蛋白質のN-結合オリゴサッカリドに $\alpha 2, 6$ 結合のシアル酸を付加しない。（Mutsaers等Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986年) ; Takeuchi等 J. Chromatogr. 400, 207 (1987年)）。従ってCHO 細胞で生産される組み換えエリスロポエチンには、ガラクトースに2, 6 結合したシアル酸が欠けている（前述のSasaki等 (1987年) ; 前述のTakeuchi等 (1987年)）。本発明の他の態様に於て、イソフォームを生産するために用いられるエリスロポエチンは、機能的 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ シアリルトランスフェラーゼ遺伝子で形質転換（トランスフェクション）し、ガラク

トースに α 2,6結合したシアル酸を組み込むCHO細胞内で生成する。改変したCHO細胞又は他の哺乳動物宿主細胞を作成する技法の開示については、参照により本明細書に含めるLee等J. Biol. Chem. 264, 13848 (1989年)を参照。

【0033】ヒトエリスロポエチンの類似体も又本発明に含まれる。ここで使用した「ヒトエリスロポエチンの類似体」とは、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列が1個以上変化しグリコシル化部位(例えばシアル酸結合部位)の数が増加したエリスロポエチンを称する。類似体は、グリコシレーションに有用である部位に変える、アミノ酸残基の付加、欠失又は置換を含む部位特異的突然変異により生じる。このような類似体は、ヒトエリスロポエチンよりも多数の炭水化物鎖を有する。

【0034】生物学的活性が増加した類似体は、エリスロポエチン分子のシアル酸含有量を増加させることにより構築される。ヒトエリスロポエチンで見いだされたシアル酸よりも多くのシアル酸を有する類似体は、生物学的活性に必要な二次又は三次構造を乱さないグリコシレーション部位を付加することにより生じる。有利には、ヒトエリスロポエチンの類似体は、N-グリコシレーション又はO-グリコシレーションのための1,2又は3個の追加部位を有する。例えば、69の位置のロイシンを、アスパラギンに置換しN-グリコシレーションのための四番目の部位として供する配列Asn-Leu-Serを生じさせる。このような変化は、通常、分子当たり4個までの追加シアル酸を提供することができる。追加N-又はO-グリコシレーション部位を生じさせる他の変化の例としては、125及び127の位置のアラニンをそれぞれアスパラギン及びセリンに、125の位置のアラニンをスレオニンに、124及び125の位置のアラニンをそれぞれプロリン及びスレオニンに変える例が挙げられる。本発明が、グリコシレーションのための追加部位を有するヒトエリスロポエチンの他の多くの類似体を含むことは当業者に明白である。

【0035】治療学上効果的な量の特定のイソフォームもしくはイソフォームの混合物又はエリスロポエチン類似体、及びエリスロポエチン治療に於て有用な希釈剤、アジュバント及び/又は担体を含む医薬用組成物も本発明に含まれる。ここで使用した「治療学上効果的な量」とは、所定の条件及び投与計画で治療の効果を提供する量をいう。エリスロポエチンイソフォーム又はエリスロポエチン類似体の投与は、非経口的経路によるのが好ましい。特定の経路の選択は、治療する状態による。エリスロポエチンイソフォーム又はエリスロポエチン類似体の投与は、好ましくはヒト血清アルブミンのような適切な担体、緩衝塩溶液のような適切な希釈液及び/又は適切なアジュバントを含む剤形として行う。必要用量は、患者のヘマトクリットを上昇させるのに十分な量であり、それは治療を受ける患者の重症度、用いる投与方法により変わる。

【0036】

【実施例】本発明の実施例を以下により具体的に示すが、これらの実施例に限定されるものではない。実施例のインビボバイオアッセイに於て用いたエリスロポエチン標準は、部分的に精製した尿性エリスロポエチン標準に対して標準化した組み換えエリスロポエチン標準である。このように、相対インビボ比活性のみを測定する。又、用いたエリスロポエチン標準が存在する国際規格と直接関連しないことから、インビボ比活性は、“U/ml”, “U/mg”, 及び“U/A₂₈₀”で表し、“IU/ml”, “IU/mg”及び“IU/A₂₈₀”とはしない。

【0037】実施例1：組み換えエリスロポエチンイソフォームの単離

組み換えエリスロポエチンは前述のLinに記載された通りに製造する。一回目及び三回目のイソフォーム単離の出発物質として用いた組み換えエリスロポエチンは、前述のLai等の実施例2に記載の手順により精製した。二回目及び五回目のイソフォーム単離の出発物質は、前述のLai等の、Q-セファロースクロマトグラフィーの変法により精製した。これらの調製物は、尿由来のヒトエリスロポエチンと同じアミノ酸配列を有する組み換えエリスロポエチンのイソフォーム混合物を含み、主にイソフォーム9-14を含む。四回目のイソフォーム調製の出発物質は、Lai等の実施例2に於て陰イオン交換カラムの洗液、5mM酢酸/1mMグリシン/6M尿素により溶出した物質である。このフラクション(画分)は、9個以下のシアル酸を有するイソフォームを含み、Lai等の実施例2に記載されている通りに調製用等電点電気泳動の使用に先立ちゲル濾過クロマトグラフィーによりさらに精製した。六回目のイソフォーム調製に於て、4から13個のシアル酸残基を有する組み換えエリスロポエチンの精製した調製物を出発物質として用いた。この物質は、出発物質に存在するほとんどのイソフォームを保持できるイオン交換カラム(pH 8.4の塩化ナトリウム勾配での組み換えエリスロポエチンの溶出、及び酢酸/尿素洗浄の省略)への改変を除いてはLai等の実施例2に従って精製した。

【0038】個々のイソフォーム6種類の調製を、実質的にエルケービー社の指示書番号198に従って、顆粒化ゲルベッド(ウルトロデックス(Ultradox)、エルケービー社)に於る調製用等電点電気泳動により行った。ファルマライト(Pharmalyte)(ファルマシア社)2.5-5アンフォライト(ファルマシア社)を用い、ゲルベッドは5Mの尿素を含む。

【0039】一回目の調製に於て、6.8mlの20mMクエン酸ナトリウム/100mM塩化ナトリウムpH 7.0に溶解させた約20mgの組み換えエリスロポエチンをゲルに供し、8ワットで約16時間フォーカスした。等電点電気泳動後、ゲル中のイソフォームバンドをゲルベッドの紙接触プリントにより可視化した。プリントした後、固定液

(40%メタノール/10%酢酸/10% TCA/3.5 %スルホサルチル酸)に3回(室温でそれぞれ約10分)浸漬することにより固定し、40%メタノール/10%酢酸(30-60℃)に一回(約10分)供し、分離したイソフォームを可視化するために、60℃の0.125%クマシーブルー R-250/40%メタノール/10%酢酸中で15分間染色した後、7.5%メタノール/10%酢酸中で脱色した。イソフォームを含む顆粒化ゲルベッド部分(樹脂の約50%)を取り出し、水を加え(約16ml)、スラリーを5.5×24.5インチのトレイに注ぎ、全重量が約40g になるまで蒸発濃縮した。この調製物を再度フォーカスし、ゲルベッドの接触プリントを前述の通りに作製した。6個の識別可能なイソフォームのそれぞれを含むゲル部分をゲルベッドから取り出した。

【0040】ゲルからイソフォームを溶出させるために、10mMトリス-HCl pH 7.0/5mM Chaps を含む溶液を各イソフォームに加え、スラリー状にした。このスラリーを小カラムに移し、トリス-Chaps緩衝液で洗浄した。この通過液を集め、20%エタノール/10mMトリス-HCl pH 7.0で平衡化したVydac C4逆相樹脂を充填した小カラム(開口型)にそれぞれ供した。このカラムは、20%エタノール/10mMトリス-HCl, pH 7.0、35%エタノール/10mMトリス-HCl, pH 7.0及び65%エタノール/10mMトリス-HCl, pH 7.0を用いて段階的に展開した。65%エタノール/10mMトリスで溶出したフラクションを、10mMトリス-HCl, pH 7.0を用いて1:1に希釈し、濃縮に供した後、セントリコン(Centricon)-10(アミコン社)微量濃縮器を用いて10mMトリス-HCl, pH 7.0にバッファー交換した。この調製物の分析用等電点電気泳動を、5Mの尿素を含むポリアクリルアミドゲル中で、セルバライト(Servalyte)-5 アンホリン(セルバ社)を用いて、本質的に、エルケイビー社の指示書番号250に記載されている通りに行った。

【0041】二回目の調製に於て、6.5mlの脱イオン水に溶解させた約26mgの組み換えエリスロポエチンをゲルに供し、2.5ワットで35分及び10ワットで約17時間フォーカスした。ゲルベッド中に観察することができるフォーカスした蛋白質のバンドを11の異なったプールとして取り出した。各プールを脱イオン水で約7.5 mlにし、その結果できた各プールの上澄液20mlを前述の通りに分析用等電点電気泳動に供した。各プールに5mlの1.5Mトリス-HCl, pH 8.8を加え、スラリーをそれぞれ小カラムに移し、液相を通過させた。樹脂を約3倍容量の0.5Mトリス-HCl, pH 7で洗浄し、洗液を通過液と合わせた。この溶出液を濃縮し、1万ダルトン分子量濾別用アミコン使い捨て限外濾過装置を用いて20mMクエン酸ナトリウム/100mM 塩化ナトリウムpH7.0にバッファー交換した。しかる後、この濃縮液(約0.5ml)を0.22ミクロンカットオフの酢酸セルロースフィルターを通過させた。分析用等電点電気泳動に基づいて、5個のプールが単一のイソ

フォーム 10, 11, 12, 13及び14を主に含むことが判明した。

【0042】3回目の調製に於て、21.8mlの蒸留水に溶解させた約30mgの組み換えエリスロポエチンをゲルに供し、2ワットで25分間、10ワットで20時間及び15ワットで15分間フォーカスした。個々のイソフォームに対応する蛋白質のバンドを肉眼的に観察し、ゲルベッドから取り出した。ゲルから分離したイソフォームに蒸留水を加えてスラリーを生じさせ、その結果できた上澄液を分析用等電点電気泳動により分析した。各スラリーに等容量の1Mトリス-HCl, pH 7.2を加え、懸濁液をそれぞれ小カラムに移し、このカラムに液相を通過させてイソフォームを溶出させた。各通過液を濃縮し、1万ダルトン分子量カットオフのアミコン使い捨て限外濾過装置を用いて20mMクエン酸ナトリウム/100mM 塩化ナトリウムpH7.0にバッファー交換した。分析用等電点電気泳動ゲルにより、単一のイソフォーム 9, 10, 11, 12, 13及び14を主に含むプールが得られたことが示された。

【0043】四回目のイソフォーム調製に於て、イソフォーム3-9を含むエリスロポエチン(前述の通りに調製)を出発物質として用いた。調製用等電点電気泳動を本質的に前述の調製1-3の通りに行うに先だって、等電点の低い出発物質のためにより適切なアンホライトレンジを得るためにロトフォー(Rotofor、バイオラッド社、リッチモンド、カルフォルニア)液相等電点電気泳動セル中でアンホライト(ファルマライト2.5-5)を前分画した。前分画は、6.7mlのファルマライト2.5-5を15gの尿素と混合し、精製した水を加えて50ml容量にすることにより行った。この混合液は、ロトフォー中で10ワット、1℃で5時間半、陽極液及び陰極液としてそれぞれ0.1M磷酸及び0.1M水酸化ナトリウムを用いて分画した。4.5から約6の測定pHを有するアンホライトフラクションをフラットベッド等電点電気泳動に用いた。

【0044】セントリエリユーター(Centri-eluter、アミコン社、デンバー、マサチューセッツ)及び10,000 MW カットオフのセントリコン(アミコン社)を用い、以下のパラメーター、即ち、0.18トリス緩衝液pH8.8、100ボルト、25-30 mA、3時間で、イソフォームからアンホライトを取り除いた。しかる後、セファデックスG-25(ファルマシア)を用いてゲル濾過によりイソフォームを0.1M塩化ナトリウムにバッファー交換した。この結果できた5個のプールの分析用等電点電気泳動は、イソフォーム4, 5, 6, 7及び8を含むことを示した。イソフォーム4はいくつかのバンドに分かれたが、これは分解を受けたことを示唆している。

【0045】五回目のイソフォーム調製は、フラットベッド等電点電気泳動の手法にプレフォーカシングステップを加えることにより改変した。この改変に於ては、電気泳動前にアンホライト/尿素/ゲルの混合物に蛋白質を加えず、ゲルベッドのpH勾配の形成の後に等電点電気

泳動装置に加える。75分間のプレフォーカシング (1500 ボルト・時間) 後、カソード側から 2.25-4.25cm のゲルベッド部分を取り出し、エリスロポエチン溶液と混合し、ゲルベッドにもどした。等電点電気泳動後、イソフォーム 10, 11, 12, 13 及び 14 をゲルベッドから溶出させ、セントリコーン-10 (アミコン社) を用いて限外濾過によりアンホライトから分離した。

【0046】プレフォーカシング改変は、イソフォーム調製物の紫外線吸収特性を出発組み換えエリスロポエチンのそれに、より類似させようとして考案した。スペクトル特性に於けるこの改良は、単離したイソフォームの 280 及び 260 nm に於ける吸収の比率に見いだすことができる。調製物 2 及び 3 (プレフォーカスなし) のイソフォームの 260 nm の吸収に対する 280 nm の吸収の平均比率 (A_{280}/A_{260}) は、 1.36 ± 0.11 であり、一方、調製物 5 及び 6 (プレフォーカスあり) の A_{280}/A_{260} の平均比率は 1.68 ± 0.20 である。イソフォーム #14 を計算から除外した場合、調製物 2&3 及び 5&6 の平均 A_{280}/A_{260} 比率は、それぞれ 1.39 ± 0.11 及び 1.74 ± 0.09 である。(イソフォーム 14 は、その存在が最も少量であり、そのためアンホライト成分による痕跡量のコンタミネーションによって干渉されやすいこと、又はフラットベッド等電点電気泳動操作に於て電極に最も近接していることから最も不規則なスペクトルを有する。) Lai 等の実施例 2 (前述したように陰イオン交換樹脂として Q-セファロースを用いることにより改変) に従って調製した組み換えエリスロポエチンの平均 A_{280}/A_{260} 比率は 1.91 ± 0.04 である。

【0047】前述したように、イソフォーム調製物 #6 の出発物質は、イソフォーム 4-13 を含む組み換えエリスロポエチン調製物であった。アンホライトは四回目の調製と同様にロトフォー装置内でプレフォーカスした。3.7 から 4.8 の測定 pH を有するアンホライト分画をフラット*

表 1

エリスロポエチン イソフォーム	モル シアル酸/ モル エリスロポエチン
イソフォーム 13	12.9 ± 0.5
イソフォーム 12	11.8 ± 0.2
イソフォーム 11	11.0 ± 0.2
イソフォーム 10	9.8 ± 0.3
イソフォーム 9	8.9 ± 0.6
イソフォーム混合物 (9-14)	11.3 ± 0.2

【0050】実施例 3: 組み換えエリスロポエチンイソフォームの活性
実施例 1 に記載した通りに単離したイソフォームは、28

* ベッド等電点電気泳動に用いた。フラットベッドは #5 と同様にプレフォーカスし、限外濾過 (セントリコーン-10) して担体としてのアンホライトを取り除いた後、イソフォーム 9, 10, 11, 12 及び 13 を得た。

【0048】実施例 2: 組み換えエリスロポエチンイソフォームのシアル酸含有量

実施例 1 に記載した通りに単離したイソフォーム及び前述の Lai 等の手法に従って精製したエリスロポエチン (イソフォーム 9 から 14 の混合物) は、0.10-0.15 M の塩化ナトリウムにバッファー交換し、Jourdain 等, J. Biol. Chem. 246, 430 (1971 年) の方法を改変してシアル酸含有量を分析した。シアル酸残基は、0.35 M の硫酸を用い 80℃ で 30 分間の加水分解により糖蛋白質から切断し、分析に先立ち、水酸化ナトリウムでこの溶液を中和した。存在するエリスロポエチン蛋白質の量を算定するために、標準としてヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列を有する組み換えエリスロポエチンを用いて、ブラッドフォード蛋白質アッセイ (Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976 年) を、パイオラッド社の分析試薬を用い、同社の微量分析法に従って行った。エリスロポエチンのモル当りのシアル酸のモルとして表した結果を表 1 に示す。イソフォームは、分子当りのシアル酸の数に従って命名し、低酸性 (イソフォーム 9) から高酸性 (イソフォーム 13) までの範囲であった。イソフォーム 9-13 は図 1 のゲルレーン 6-10 に示される。イソフォーム 14 の量は、正確にシアル酸含有量を測定するのに不十分である。このイソフォームのシアル酸含有量は、他のイソフォームとの相対的な IEF ゲル上の移動により推定した。イソフォーム 5-8 (調製物 #4) のシアル酸含有量は、測定しなかったが、同様に IEF ゲル上の移動により推定した。

【0049】

【表 1】

0nm に於ける吸収、ブラッドフォード蛋白質アッセイ及びエリスロポエチンの RIA により分析し、存在する組み換えエリスロポエチンの量を決定した。低酸素赤血球増加

症マウスパイオアッセイ (Cotes 等 Nature 191, 1065 (1961年)) を用いて、相対インビボ生物学的活性を決定した。エリスロポエチンのラジオイミュノアッセイを用いたエリスロポエチン蛋白質の定量は、一部のイソフォームが高い相対インビボ比活性を有するという結果を生じた。なぜならば、多数のシアル酸を含むイソフォームの見かけの減少した免疫反応性は、エリスロポエチン濃度の過小評価をもたらし、従って最も負に荷電したイソフォームの相対インビボ比活性の過大評価をもたらしたからである。U/mgで表したマウスパイオアッセイの測定値を対応する蛋白質濃度で除して、U/mgエリスロポエチンペプチドで表したインビボ比活性をだした。これらの比活性を表2に示す。

【0051】表2に於て、“n”は比活性値に寄与する独立したイソフォーム調製物の数を表す。ほとんどの場合、各イソフォーム調製物に於て数回のインビボ分析をおこなった。同じインビボデータが3個のカラム全ての比活性計算に寄与し、U/mgエリスロポエチンポリペプチドは、280nmの吸収、ラジオイミュノアッセイ又はブラッドフォード蛋白質アッセイの結果により決定した。イソフォーム9-14を含む精製した組み換えエリスロポエチンをブラッドフォード蛋白質アッセイの標準として用いた。“n”はブラッドフォード蛋白質アッセイによる計*

表 2

イソフォーム	U/mgポリペプチド (ブラッドフォード蛋白質アッセイ)	n	U/mgポリペプチド (A280より)	n	U/mgポリペプチド (RIAより)	n
14	289,400±3,100	2	205,800±37,700	2	366,700±55,900	2
13	307,600±30,600	4	258,700±59,500	5	337,200±40,200	5
12	275,200±55,600	4	258,400±41,700	5	287,700±42,600	5
11	282,700±41,100	3	255,800±67,300	4	251,400±62,700	4
10	188,000±1,900	1	170,300±34,500	3	171,900±31,600	3
9	-	-	96,600±46,700	2	113,600±39,600	2
8	65,200±3,800	1	70,600±4,100	1	61,000±3,500	1
7	46,200±5,800	1	50,300±6,300	1	42,800±5,400	1
5	16,600±1,700	1	18,300±1,900	1	15,500±1,600	1

【0055】表2のデータはまた、図2A, 2B及び2Cに図式的に示す。これらのデータは、エリスロポエチンの相対インビボ活性がイソフォーム#11までシアル酸含有量の関数として増加することを示す。イソフォーム11-14は、本質的に同じ相対的インビボ生物活性を有する。

(これは、イソフォーム14の濃度をブラッドフォードアッセイ値を用いて表した場合最も明らかである。ブラッドフォード値はイソフォーム14にとってより正確である。なぜなら、得られる量が通常少なく A₂₈₀ による決定が困難であり、既に述べた非常に負荷電型のRIAに於て最も見かけの反応性が減少したからである。) より多くのシアル酸を有するエリスロポエチンイソフォームの相対インビボ比活性が高いのは、これらのイソフォームの循環半減期がより長いということが考えられる。イソフォーム9及び13を放射性ヨウ素 (¹²⁵I) で標識し、そのラットに於るクリアランス率を決定した。循環半減

*算では、ブラッドフォードアッセイを行った時点でいくつかの調製物は利用不能になったので、少なくなっている。

【0052】前述のLai等の手法により精製した、イソフォーム9から14の混合物を含むエリスロポエチンを、RIA及びインビボ分析の標準として用いた。

【0053】U/mgエリスロポエチンポリペプチドとして表される相対比活性は、0.807mg エリスロポエチンポリペプチド/A₂₈₀ を掛けることにより U/A₂₈₀ に変換することができる。変換係数は、エリスロポエチンの吸光定数 (1.345 mg/A₂₈₀) にエリスロポエチン糖蛋白質の蛋白質含有量 (約60重量%, Davis 等 Biochemistry 26, 2633 (1987年)) を掛けることにより求める。こうして求め、mgエリスロポエチンポリペプチド/A₂₈₀ (すなわち、1.345 mgエリスロポエチン/A₂₈₀ × 0.60mgポリペプチド/mgエリスロポエチン = 0.807 mgポリペプチド/A₂₈₀) を得る。さらに、U/mgエリスロポエチンポリペプチドとして表される比活性に、ファクター、0.60 mgポリペプチド/mgエリスロポエチン糖蛋白質を掛けて、U/mgエリスロポエチン糖蛋白質として表される比活性をだすことができる。

【0054】

【表2】

期は、イソフォーム9よりイソフォーム13の方がかなり長かった。

【0056】実施例4: Q-セファロースクロマトグラフィーによる組み換えエリスロポエチンイソフォーム混合物の選出

前述のLinの手法による組み換えエリスロポエチンの生産から得た細胞ならし培地を濃縮し、10mMトリス, pH7.2で透析濾過した。蛋白質濃度は、標準としてウシ血清アルブミンを用いてブラッドフォード微量蛋白質アッセイにより決定した。40mgの全蛋白質を含んだ19.6 mlの溶液に20μMになるようにCuSO₄を加え、0.45ミクロンカットオフのフィルターで濾過し、前もって10mMトリス, pH6.8から7.0を用いて4℃で平衡化したQ-セファロースファーストフロー (ファルマシア社) を充填したベッドボリューム4ml (高さ1.05cm, 直径2.2cm) のカラムに供した。試料供試後、カラム容量の2倍容量の同

じ緩衝液でカラムを洗浄した。カラムの流速は約1ml/分である。この手法を用いて6個のカラムを別々に準備し、限定したエリスロポエチンイソフォーム混合物を選出した。

【0057】カラムは、カラム容量の6から9倍の以下の成分からなる低pH緩衝液、即ち、カラム#1は、150mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素、NaOHでpH 4.7に調整；カラム#2は、200 mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素、NaOHでpH4.7に調整；カラム#3は、250mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素、NaOHでpH4.7に調整；カラム#4は、300mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素、NaOHでpH 4.7に調整；カラム #5 は、150mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素；カラム#6は、300mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄、6M尿素で洗浄した。カラムのpHは、各カラムをカラム容量の8から11倍の10mMトリス-HCl、55mM NaCl、20μM CuSO₄、pH 7の緩衝液で洗浄することにより約pH 7に増加させた。限定したエリスロポエチンイソフォーム混合物は、10mMトリス-HCl、140mM NaCl、20μM CuSO₄、pH 7.0で洗浄することによりカラムから溶出させた。

【0058】各カラムから溶出させたイソフォームのブールを濃縮しアミコンセントリコーン-10 微量濃縮装置を用いて溶媒を水で置換した。これらの濃縮ブールの分析用等電点電気泳動の結果を図3に示す。ゲルレーン1-6は、それぞれカラム1-6から溶出させた限定したエリスロポエチンイソフォーム混合物を表す。図3の右端のゲルレーンに示される“イソフォーム混合物”は、前述した通りにQ-セファロースカラムに供した細胞培地を表す。このカラムを5mM 酢酸、1mM グリシン、20μM CuSO₄及び6M尿素を含む溶液で洗浄し、エリスロポエチンイソフォーム混合物を、前述の手法を用いてカラムから溶出させた。分析用等電点電気泳動に先立ち、この溶出したイソフォーム混合物をさらに前述のLai等の手法により精製した。

【0059】実施例5：Q-セファロースの低pH勾配を用いた組み換えエリスロポエチンイソフォームの分画 *

[Asn⁴, Ser⁶] EPO: 5' CGCCCACCA~~AA~~CCTCAGCTGTGACAGCCGA 3'
 [Asn⁹, Ser¹¹] EPO: 5' ATCTGTACA~~AC~~CGAAGCCTGGAGAGGT 3'
 [Asn⁶⁹] EPO: 5' GGGCCTGGCC~~AA~~CCTGTGCGGAAG 3'
 [Asn¹²⁴] EPO: 5' TCCCCCTCCAGAT~~AA~~TGCCTCAGCTGC 3'
 [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCG~~AA~~CTCATCTGCTCCAC 3'
 [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵] EPO: 5' AGGCCTGCAGG~~AA~~TGGGAGCAGATGACCAGGTG 3'
 [Thr¹²⁵] EPO: 5' TCCAGATGCG~~AC~~CCTCAGCTGCTC 3'
 [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO: 5' CCTCCAGAT~~CC~~GACCTCAGCTGC 3'.

【0063】下線を引いたコドンは、かっこで示したアミノ酸が野生型のアミノ酸と置き変わった不適正部分を

*他の手法に於ては、エリスロポエチンイソフォームはpHが減少しイオン強度が増加する勾配を用いて分離する。濃縮した透析濾過エリスロポエチン含有培地を、約40mgの全蛋白質/mlゲルの割合でQ-セファロースカラムに供した。しかる後、カラムを、カラム容量の約2倍の10mM トリス-HCl、pH 7.0で、次にカラム容量の約10倍の2mM 酢酸/1mM グリシン/20μM CuSO₄/6M尿素 (pH約4.8)で洗浄し、混入蛋白質及び約7未満のシアル酸残基を有するエリスロポエチンイソフォームを取り除いた。約8個から約12個のシアル酸を含むイソフォームを、約2mM 酢酸/6M尿素/1mM グリシン/20μM CuSO₄から始まって40mM酢酸/6M尿素/1 mMグリシン/20μM CuSO₄ (pH 約4)までの勾配を用いてカラムから溶出させた。勾配の全容量はカラム容量の約40倍であり、カラム容量とほぼ同量の各フラクション (分画) を、集めたフラクションを長時間低pHにさらすのを避けるためpHを6-8.5の範囲にするのに十分な量のトリス緩衝液を含む容器に集めた。フラクションの一部を分析用等電点電気泳動に供し分離をモニターした。図4は、この手法により達成することができるイソフォーム8-11の分離を示す。勾配を終えた時点でカラムに結合したままのイソフォーム12-14を10mM トリス-HCl、140mM NaCl、20μM CuSO₄ (pH 7.0)から成る緩衝液で洗浄することにより溶出した。Lai等の実施例2に記載したように、逆相クロマトグラフィー、続いてゲル濾過クロマトグラフィーにより、混入蛋白質をイソフォーム (勾配中に分離又は塩化ナトリウム溶液により溶出) から除去した。

【0060】実施例6：追加グリコシレーション部位を有するヒトエリスロポエチンの類似体

A. ヒトエリスロポエチン類似体の構築

エリスロポエチンのアミノ酸配列の既存及び計画の炭水化物結合部位を図5に示し、これらの追加グリコシレーション部位作出の手法を、図6A-C及び以下に示した。

【0061】以下のオリゴヌクレオチドプライマーを、インビトロ突然変異用に合成した。

【0062】

【表3】

【0064】[Asn⁴, Ser⁶]EPOは、Asn 4にN-グリコシ

19

レーション部位を付加させるために構築した。[Asn⁹, Ser¹¹]EPOは、Asn 9にN-グリコシレーション部位を付加させるために構築した。[Asn⁶⁹]EPOは、Asn 69にN-グリコシレーション部位を付加させるために構築した。[Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPOは、Asn 125にN-グリコシレーション部位を付加させるために構築した。[Thr¹²⁵]EPO及び[P*

[Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO: 5' GGGCCTGGCCAACTGACAGAAGCTGTC 3'

[Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO:

5' CAGGGCCTGTCCAACTGACAGAAGCTGTC 3'

[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCGAACTCAACGGCTCCAC 3'

[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹] EPO:

5' ATGCGAACTCAACGGCTCCACTCACAACAATCACT 3'

[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO:

5' CCAGATCCAAATTCATCTGCTCCACTC 3'

[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO:

5' CCAGATCCAAATTCACAGCTCCACTC 3'

[Thr¹²⁵, Thr¹²⁶] EPO: 5' CCAGATGCGACACAGCTGCTCCA 3'

【0067】[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹]EPO: [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO cDNA から開始して、オリゴヌクレオチドプライマー5' AGATCCGACCACCGCTGCTCCAC 3' を用いて[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶]EPOを作出した。しかる後、オリゴヌクレオチドプライマー5' TGCTCCACTCACAACAATCACTG 3' を用いて[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹]EPOを作出した。

【0068】[Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO及び[Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPOはAsn 69にN-グリコシレーション部位を付加させ、この部位のN-グリコシレーションを促進するために構築した。[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷]EPO, [Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹]EPO, [Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO及び[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷]EPOはAsn 125にN-グリコシレーション部位を付加させ、この部位のN-グリコシレーションを増加させるために構築した。[Thr¹²⁵, Thr¹²⁶]EPO, 及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Ser¹³¹]EPOはThr 125にO-グリコシレーション部位を付加させ、この部位のグリコシレーションを増加させるために構築した。

【0069】インビトロ突然変異用エリスロポエチンDNAの材料は、pUC 8中のヒトエリスロポエチンcDNAクローン、プラスミド Hu13 (Law 等Proc Natl. Acad. Sci. 83, 6920 (1986年))である。Hu13から誘導された

20

*ro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPOは、Thr 125にO-グリコシレーション部位を付加させるために構築した。

【0065】以下のオリゴヌクレオチドプライマーを、インビトロ突然変異用に合成した。

【0066】

【表4】

プラスミドDNAは、BstEII及びBglIII制限酵素で切断し、その結果できたDNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動に供し、ジェネクリーン (GeneClean, TM) キット及び製造元 (BIO 101社) から供された手法を用いて810塩基対(bp)エリスロポエチンDNAフラグメントをゲルから分離した。プラスミド pBRgHuEPOは前述のLin特許に記載があるよう導体に挿入したBamHIフラグメントのようなエリスロポエチンゲノム遺伝子を含む。pBRgHuEPOは又BstEII及びBglIIIで消化し、6517bpベクターフラグメントを回収した。この2個のフラグメントの連結によってIGT1を得た。pEC-1を構築するために、pDSVL (Lin特許に記載があり、又図5Bに示す)をBamHIで切断し、エリスロポエチンcDNAを含むIGT1から単離した2.8キロベース(kb) BamHIフラグメントをこれに連結した。

【0070】インビトロ突然変異用一本鎖DNAを作出するために、pEC-1をBamHI及びBglIIIで切断し、820bpエリスロポエチンcDNAフラグメントを単離した。これをm13mp18のBamHIサイトに連結しm13-EC-1を作出した。Kunkel等 Methods in Enzymol. 154, 367 (1987年) 及び Messing, Methods in Enzymol. 101, 20 (1983年) により記載されている通りに、m13-EC-1に感染させた大腸菌RZ1032株の上澄液から一本鎖DNAを回収し

21

た。インビトロ突然変異のために、約1 μ g の一本鎖DNA及び0.2 pmole の前述の合成プライマーの1種を6mlの緩衝液(250 mM トリス pH 7.8, 50mM MgCl₂ 及び50mM ジチオスレイトール)と混合した。鋳型にプライマーをアニーリングをするために、反応容量を水で10 μ l に調整し、この混合液を65℃で5分間加熱した後室温まで冷却した。鎖延長反応のために、dTTP, dATP, dGTP, dCTP 及びATP (全て10 μ M) の各2.5ml を加え、引き続き1 μ l (1ユニット) 大腸菌DNA ポリメラーゼ(クレノウフラグメント)及び1 μ l (1ユニット) のT4 DNAリガーゼを加えた。しかる後、この混合液を14℃で一晩保温し、前述のMessing のように大腸菌JM 109 (Yanisch-Perron 等 Gene 33, 103 (1985 年)) を形質転換するために用いた。

【0071】ディファレンシャル(differential)ハイブリダイゼーション法による突然変異クローンを同定するために、普通寒天培地上のブランクをジーンスクリーンフィルター(ニューイングランドヌクレアー社)に移した。このフィルターを加熱灯で乾燥させた後、1% SDSを含む60℃の6×SSC 中で1時間保温した。ハイブリダイゼーションのために、前記のオリゴヌクレオチドプライマー(8pmoles)にT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び γ -³²P 標識ATP で末端標識し、フィルターと共に、[Asn¹²⁴]突然変異については37℃で、[Asn⁴, Ser⁶]突然変異については55℃で、[Thr¹²⁵]及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]突然変異については65℃で、及び[Asn⁹, Ser¹¹]及び[Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵]突然変異については70℃で6×SSC、0.5% SDS及び100mg/ml サケ精子DNA 中で一晩保温した。翌日、フィルターを室温にて6×SSC を用いて3回洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。必要に応じて、この後、本来のエリスロポエチンcDNA配列を有するブランクにハイブリダイゼーションがほとんど又は全く検出されなくなるまで、温度を上げてフィルターを6×SSC で洗浄した。これらの条件下で陽性のハイブリダイゼーションシグナルを示すクローンを同定し、JM 109に再感染させて純粋なクローンを単離した。ジデオキシチェーンターミネーション配列分析は、アスパラギン、セリン、スレオニン及びプロリン残基への突然変異が存在することを示した。[Asn⁴, Ser⁶], [Asn⁹, Ser¹¹], [Asn⁶⁹], [Asn¹²⁴], [Asn¹²⁵], [Ser¹²⁷], [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵], [Thr¹²⁵]及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]の変化を担持する二重鎖m13 EC-1 DNAは、煮沸法(Holmes等Anal. Biochem 117, 193 (1981 年))によりJM 109 形質転換細胞から回収した。このDNAをBstEII及びXhoIIで切断し、810 bp エリスロポエチンDNA フラグメントを単離した。pEC-1は、BstEIIで切断し次にBgIIIで部分切断し、その結果できたフラグメントの5'末端を、細菌アルカリホスファターゼを用いて10 mM トリス、pH 8中で60℃で60分間脱リン酸した。810 bp BstEII-BgIIIフラグメントを欠いた7 kbベクターフラグメントを分離し、

22

上記のエリスロポエチンフラグメントに連結した。この結果できたプラスミド(pEC-Xと命名、ここでXは個々の突然変異を表す)は、示した位置で変更したアミノ酸残基を有するヒトエリスロポエチンを含む。

【0072】ヒトエリスロポエチン配列及び[Asn⁴, Ser⁶], [Asn⁹, Ser¹¹], [Asn⁶⁹], [Asn¹²⁴], [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷], [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵], [Thr¹²⁵]及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]エリスロポエチンcDNAクローンに対応する類似体のcDNAクローンは、エレクトロポレーションによりCOS-1細胞(ATCC No. CRL-1650)にトランスフェクトした。COS-1細胞は、半集密的皿から回収し、培地(5%牛胎児血清及び1% L-グルタミン/ペニシリン/ストレプトマイシン(アービンサイエンティフィック社)を含むダルベッコ(Dulbeco)の改変必須培地)で洗浄し、4×10⁶ cells/mlの密度で再懸濁させた。1mlの細胞を、エレクトロポレーションキュベット(バイオラッド社)に移し、100から200 μ gの担体DNA及びエリスロポエチン類似体をコードした2から20 μ gのプラスミドDNAの存在下、バイオラッドジーンパルサー(Bio-Rad Gene Pulser, TM)を用いて、25マイクロファラッド及び1600ボルトでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションした細胞を、組織培養皿(直径60mm)当り2×10⁶個で5mlの培地中に接種した。接種の2から4時間後、5mlの新鮮な培地で置き換えた。エレクトロポレーションの3から5日後、ならし(conditioned)培地を集めた。

【0073】B. エリスロポエチン類似体の活性分析
前述のEgrie等の手法に従ってRIAを行った。エリスロポエチン類似体のインビトロ生物学的活性は、低酸素赤血球増加症マウスバイオアッセイ(Cotes等、前述)により測定した。

【0074】インビトロエリスロポエチン活性は、Iscoe等J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974年)により記載されている赤芽球コロニー形成分析法を改変して測定した。ヒト骨髓細胞由来の単核化細胞を、フィコール/バクークッション(ficoll-paque cushion)上で部分精製した後、プレーティングに先立ち吸着性細胞を除くためにIscoeの培地中で洗浄した。培養培地は、0.9%メチルセルロースを含むが、牛血清アルブミンは含まなかった。培養の8から10日後、赤芽球コロニーを計数した。

【0075】セクションAに記載したように、COS細胞にトランスフェクトし発現したエリスロポエチン類似体は、RIA及び赤芽球コロニー形アッセイにより、未精製のCOS細胞上澄液中で分析した。ヒト由来配列のエリスロポエチンは、前記の分析により決定したRIA活性に比するインビトロ活性を有した。類似体の[Asn⁶⁹]EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO, [Thr¹²⁵]EPO, 及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPOは、RIA活性に比するインビトロ活性を示し、

(セクションCで決定するように)追加炭水化物鎖を有することを証明した。これらの類似体は、エリスロポエ

チン類似体をコードしているcDNAクローンをCHO細胞にトランスフェクトし、エリスロポエチン類似体を精製し、精製類似体のインビボ生物学的活性を測定することにより更に分析した。

【0076】C. ウエスタンブロット分析

セクションAに記載した通りにエリスロポエチン類似体cDNAでトランスフェクトしたCOS細胞から得た5-20 Uを含む一定量の上澄液を、ウサギ抗エリスロポエチンポリクローナル抗体を用いて室温で一晩免疫沈降させた。リン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解させたプロテインA-セファロース1:1の20-80 μ lを免疫沈降物に加え、室温で1時間保温した。この試料を遠心し、PBSで洗浄し、特に指示する場合は、ベレットをN-グリカナーゼで処理しN-結合炭水化物鎖を除去した。この試料を15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、ニトロセルロースに移して、マウス抗エリスロポエチンモノクローナル抗体の混合物を用いて、Burnette等 Anal. Biochem. 112, 195-203 (1981年)及びElliot等 Gene 79, 167-180 (1989年)に記載されている通りにウエスタン分析に供した。このような抗体の一つとして9G8AがElliot等 (1989年) Blood 74, Supp. 1, A.1228に記載されている。

【0077】[Asn⁶⁹]EPO及び[Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO cDNAでトランスフェクトしたCOS細胞上澄液の分析は、ヒト由来配列のエリスロポエチンと比較して蛋白質のサイズが増加していることを示した。このサイズの増加は、追加N-結合炭水化物鎖を示唆している(図7)。[Thr¹²⁵]EPO、及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO cDNAでトランスフェクトしたCOS細胞から得た上澄液のN-グリカナーゼ*

5' TCGAGGAAGTGAACCAACAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT /

CTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCA

AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG

AAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAACAAGCTGGTTCGACC 3'

【0081】この結果できたプラスミドがpDS α 2- Δ H スプライスである。(3)pDS α 2 Δ H スプライスは、SalIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ及びdNTPsで付着末端を処理することによりプラントエンド化した。820 bp. BamHI-BglII ヒトエリスロポエチンcDNAフラグメントは、同じ方法によりプラントエンド化し、プラスミドに連結した。この結果できたプラスミドがpDECである。

【0082】(4)pDECは、KpnI及びPvuIIで切断し、リョクトウ(mung bean)ヌクレアーゼで付着末端を処理することによりプラントエンド化した。切り出したKpnI-PvuIIフラグメントを欠落させるために再連結し、この結果できたプラスミドがpDEC Δ である。[Thr¹²⁵]エ

*を用いた処理は、ヒト由来配列のエリスロポエチンと比較して蛋白質のサイズが増加していることを示した。このサイズの増加は、追加O-結合炭水化物鎖を示唆している(図8)。

【0078】D. エリスロポエチン類似体イソフォームの単離

エリスロポエチン類似体[Thr¹²⁵]EPOは、セクションAの記載通りに構築した。[Thr¹²⁵]突然変異を担持する810 bpのエリスロポエチンcDNAフラグメントは、[Thr¹²⁵]突然変異を含むプラスミドpECをBstEII及びBglIIで切断することにより単離し、pDS α 2の誘導体であるpDEC Δ にこのフラグメントを連結した。pDS α 2は、参照により本明細書に含めた共通所有の米国特許出願番号501,904に記載されている。pDEC Δ は、以下の段階によりpDS α 2から誘導した:

(1) pDS α 2のHindIII部位は、HindIIIでpDS α 2 DNAを切断し、大腸菌DNAポリメラーゼ(クレノウフラグメント)及びdNTPsでHindIII付着末端を処理し、プラントエンド化したベクターに再連結することによって欠落させた。この結果できたプラスミドがpDS α 2 Δ Hである。

【0079】(2) pDS α 2 Δ HをSalIで切断し、これを、スプライスシグナルの3'末端に付加したSalIリンカーを含むSV40スプライスシグナルを有する合成オリゴヌクレオチドに連結した。合成オリゴヌクレオチドは、以下の配列を有した。

【0080】

【表5】

リスロポエチンcDNAを含むプラスミドpDEC Δ をDHFR-欠損CHO細胞にトランスフェクトした。CHO細胞でならした培地770 mlを1万ダルトン分子量カットオフのメンブレンを用いて濃縮し、10 mM トリス-HCl, pH 8.6で最終容量34 mlになるまで透析濾過した。濃縮液の一部(17 ml)を、同じ緩衝液で平衡化したQ-セファロースファーストフローカラム(5mlベッドボリューム)に供し、10 mM トリス-HCl, pH 8.6中の0-250 mM NaClの直線勾配によって溶出させた。カラムフラクションの一部を、未処理で又はN-グリカナーゼで切断して、SDS-PAGE又はIEFで分析し、プール(2, 3及び4と命名)をフラクションの炭水化物及び/又はイソフォームの組成に基づいて集

めた。各プールをビダク (Vydac) C4 カラム (214TPB20 30; 直径1cm; 1.8-2.5 mlベッドボリューム; 0.34ml/分) に供し、10 mM トリス-HCl, pH 7.0に溶解させた20 %エタノールのカラム容量の2 倍量で洗浄した。このカラムを 20-94%エタノールの10 mM トリス-HCl, pH 7.0 の直線勾配で溶出した。プールを集め、10mMトリス-HCl, pH 7.0で希釈し、Q-セファロースファーストフローカラムに供した。10 mM トリス-HCl, pH7.0 で洗浄した後、試料を20 mM クエン酸ナトリウム、250 mMNaCl, pH 7.0で溶出させた。精製した[Thr¹²⁵] プールをIEF に

より分析し、図9 に示した。EPO類似体は、前述 (Cotes 等、前述) したようにインビボ生物学的活性を分析した。

【0083】以上に、本発明をその好ましい実施態様を用いて説明したが、これらの態様に限定されるものではない。特許請求の範囲に記載の思想及び範囲に包含される変形物及び等価物は本発明に含まれるものであり、本発明はこのような変形物の及び等価物を全て含むように最も広い解釈によるべきである。

【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、分離した組み換えエリスロポエチンイソフォームの分析用等電点電気泳動写真である。ゲルレーン1-11は、レーン1のより非酸性 (高pI) からレーン11に於るより酸性 (低pI) までのイソフォームを示す。イソフォーム9-14の混合物を含む精製した組み換えエリスロポエチンも、ゲルの左右両端のレーンに示される。

【図2A】この図は、エリスロポエチンポリペプチドのmg当りのユニットとして表される各イソフォームのインビボ比活性と、エリスロポエチンイソフォーム当りのシアル酸の数の相関関係を示す。各エリスロポエチンイソフォーム濃度は、ブラッドフォード蛋白質アッセイにより決定した。

【図2B】この図は、エリスロポエチンポリペプチドのmg当りのユニットとして表される各イソフォームのインビボ比活性と、エリスロポエチンイソフォーム当りのシアル酸の数の相関関係を示す。各エリスロポエチンイソフォーム濃度は、280nm の吸収により決定した。

【図2C】この図は、エリスロポエチンポリペプチドのmg当りのユニットとして表される各イソフォームのインビボ比活性と、エリスロポエチンイソフォーム当りのシアル酸の数の相関関係を示す。各エリスロポエチンイソフォーム濃度はRIA により決定した。

【図3】この図は、条件の異なる陰イオン交換クロマトグラフィーにより調製した組み換えエリスロポエチンイソフォームの限定した混合物の分析用等電点電気泳動写真である。1-6 のゲルレーンは、それぞれ、150mM 酢酸 pH 4.7, 150mM酢酸 (非緩衝), 200mM 酢酸 pH 4.7, 250mM 酢酸pH 4.7, 300mM 酢酸 pH 4.7 又は300mM 酢酸 (非緩衝) でQ-セファロース高速フローカラムを洗浄

した後高塩濃度溶出液で溶出したエリスロポエチンイソフォームを表す。DEAE-アガロースクロマトグラフィーをQ-セファロースクロマトグラフィーに代えることを除いては前述のLai 等の実施例2に記載された手法を用いて得たイソフォームの混合物を含む精製した組み換えエリスロポエチンも、ゲルの左端レーンに示される。

【図4】この図は、Q-セファロースカラムにかけた細胞ならし培地をpH減少及びイオン強度増加勾配に供することにより達成した8ないし12個のエリスロポエチンイソフォームの分離を示す等電点電気泳動写真である。フラクション2からフラクション40までの偶数番号のフラクションを分析用等電点電気泳動に供した。DEAE-アガロースクロマトグラフィーをQ-セファロースクロマトグラフィーに代えることを除いては前述のLai 等の実施例2に記載された手法を用いて得たイソフォームの混合物を含む精製した組み換えエリスロポエチンも、ゲルの左端レーンに示される。

【図5】この図は、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列を示す。四角は、炭水化物鎖が結合するアスパラギン残基を示し、星印は、炭水化物で修飾されるスレオニン及びセリン残基を示す。実施例6の類似体に於て提供された追加グリコシレーション部位は、アスパラギン、セリン及びスレオニンへの突然変異により示される。

【図6A】この図は、ヒトエリスロポエチン類似体の構築及び分析用のプラスミド生成に用いた一連のクローニングステップを示す。この類似体は、図5に示すように追加グリコシレーション部位を提供する変化したアミノ酸を有する。

【図6B】この図は、ヒトエリスロポエチン類似体の構築及び分析用のプラスミド生成に用いた一連のクローニングステップを示す。この類似体は、図5に示すように追加グリコシレーション部位を提供する変化したアミノ酸を有する。

【図6C】この図は、ヒトエリスロポエチン類似体の構築及び分析用のプラスミド生成に用いた一連のクローニングステップを示す。この類似体は、図5に示すように追加グリコシレーション部位を提供する変化したアミノ酸を有する。

【図7】この図は、ヒト配列エリスロポエチン及びエリスロポエチン類似体のCOS 細胞上澄液のウェスタンブロット分析を示す。類似体の[Asn⁹, Ser¹¹], EPO, [Asn⁶⁹]EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO, 及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPOは、実施例6 に記載した通りに構築される。追加炭水化物鎖を含まない類似体の[Pro¹²⁵, Thr¹²⁷]EPO, [Asn¹²⁶, Ser¹²⁸]EPO及び[Thr¹²⁵, Ser¹²⁷]EPOを比較のために示す。

【図8】この図は、ヒト配列エリスロポエチン及びエリスロポエチン類似体のCOS 細胞上澄液のN-グリカナーゼ処理後のウェスタンブロット分析を示す。類似体の[Thr¹²⁵]EPO及び[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPOは、実施例6 に記載

27

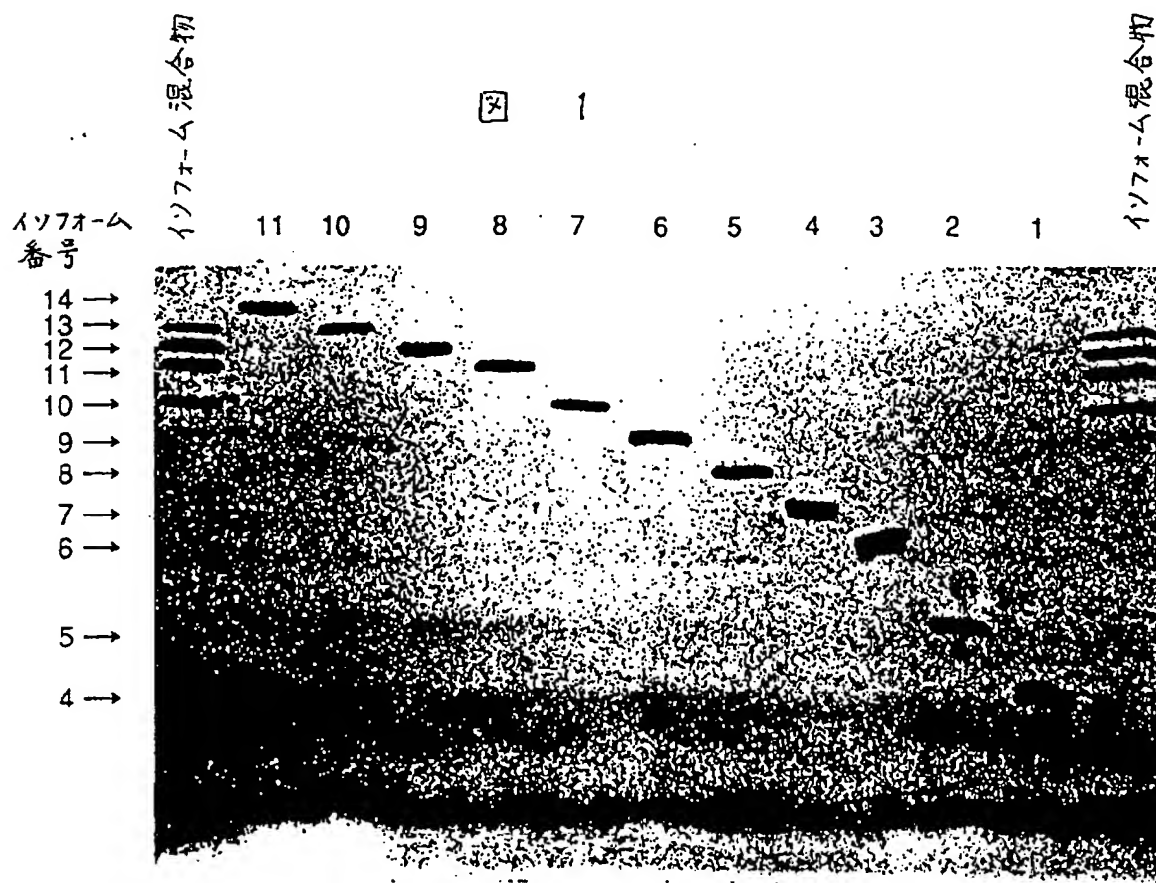
した通りに構築した。類似体の[Val¹²⁶]EPO, [Pro¹²⁴]EPO, [Pro¹²⁶]EPO, [Thr¹²⁷]EPO, [Pro¹²⁶, Ser¹²⁷]EPO及び[Thr¹²⁵, Ser¹²⁷]EPOを比較のために示す。

【図9】この図は、[Thr¹²⁵]突然変異を含むエリスロポエチンcDNAでトランスフェクトしたCHO細胞の成長を支持した細胞培地をQ-セファロース及びC4逆相クロマト

28

グラフィーにかけることにより得たプール2,3及び4の等電点電気泳動写真である。イソフォームの混合物を含む精製した組み換えエリスロポエチンは、DEAE-アガロースクロマトグラフィーをQ-セファロースクロマトグラフィーに代えたことを除いては前述のLai等の実施例2に記載した手法により得られ、これも、やはりゲルの左右のレーンに示される。

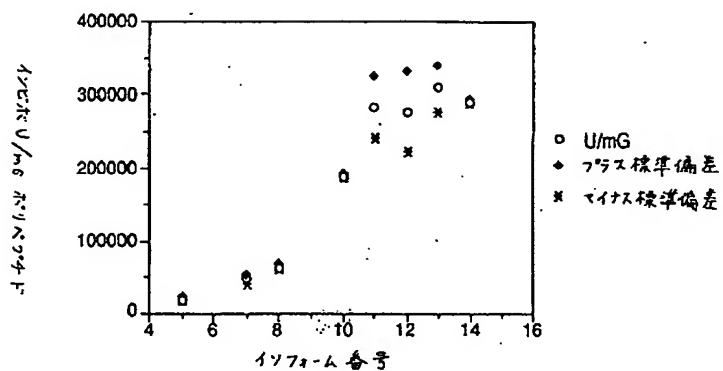
【図1】



【図2A】

図 2 A

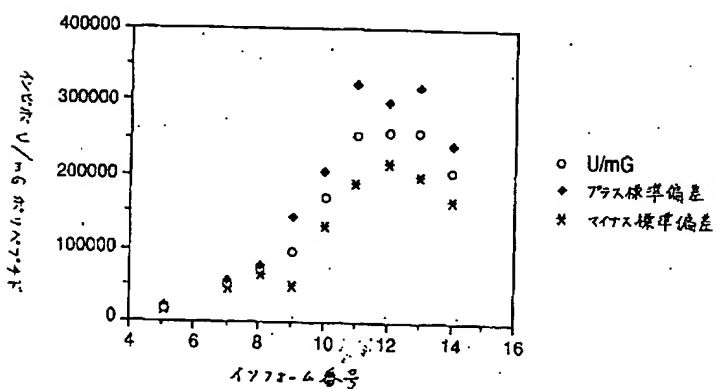
インビボ U/mG エリスロポイエチンポリペプチド (ブロードバンド蛋白質分析法による)



【図2B】

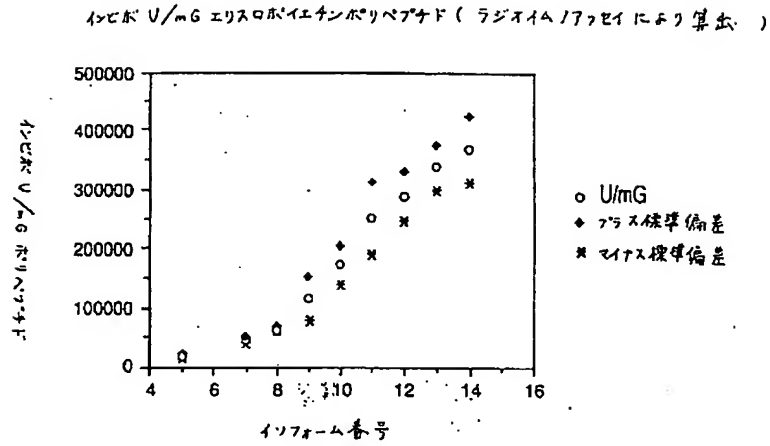
図 2 B

インビボ U/mG エリスロポイエチンポリペプチド (A₂₈₀より算出)



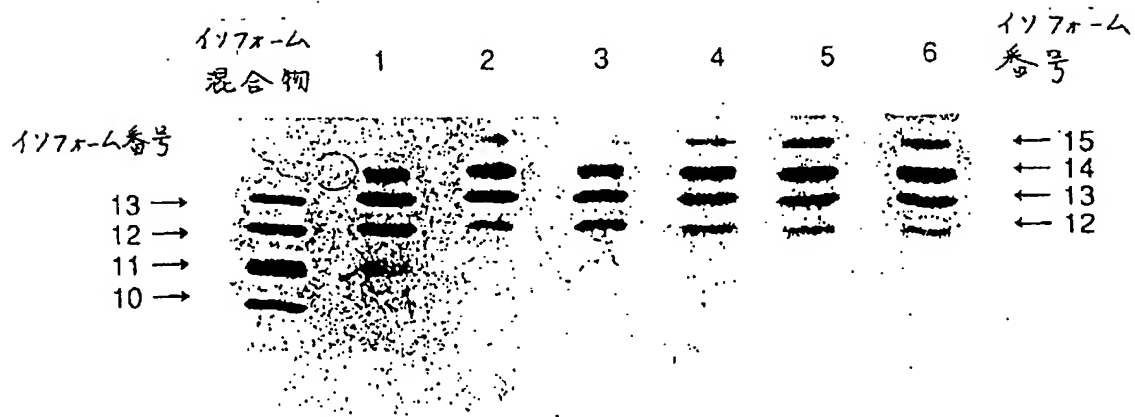
【図2C】

図 2 C

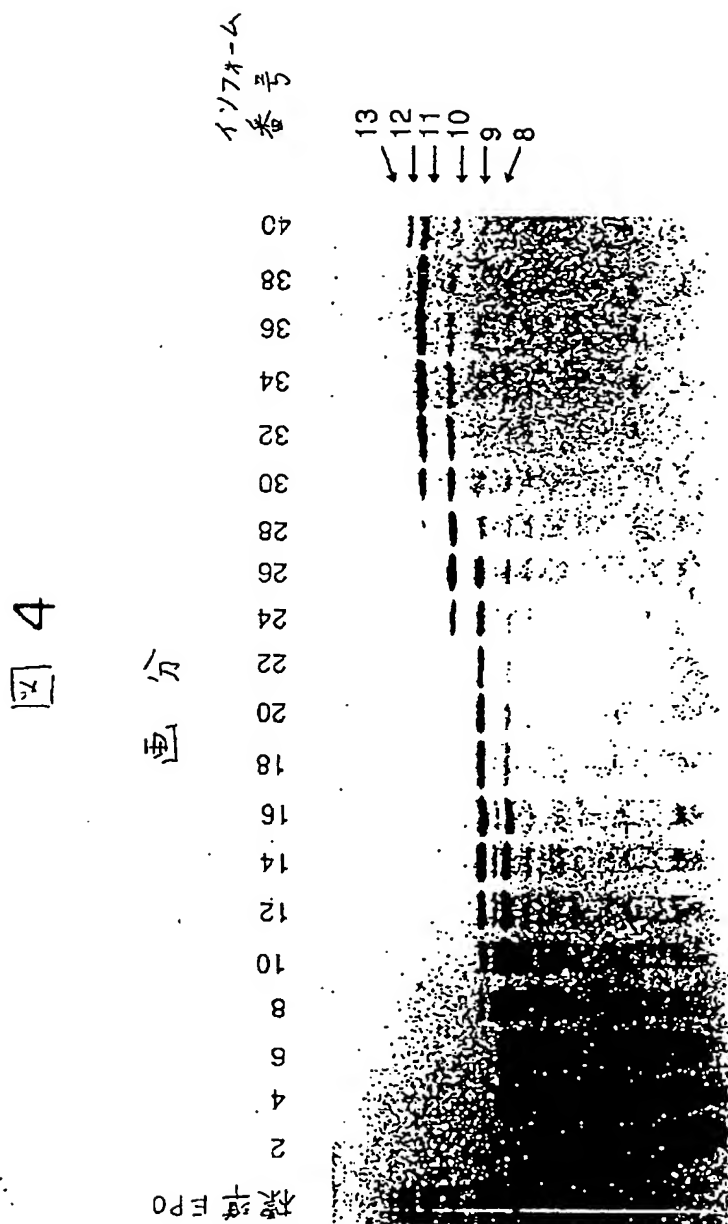


【図3】

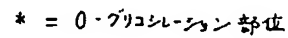
2

 3


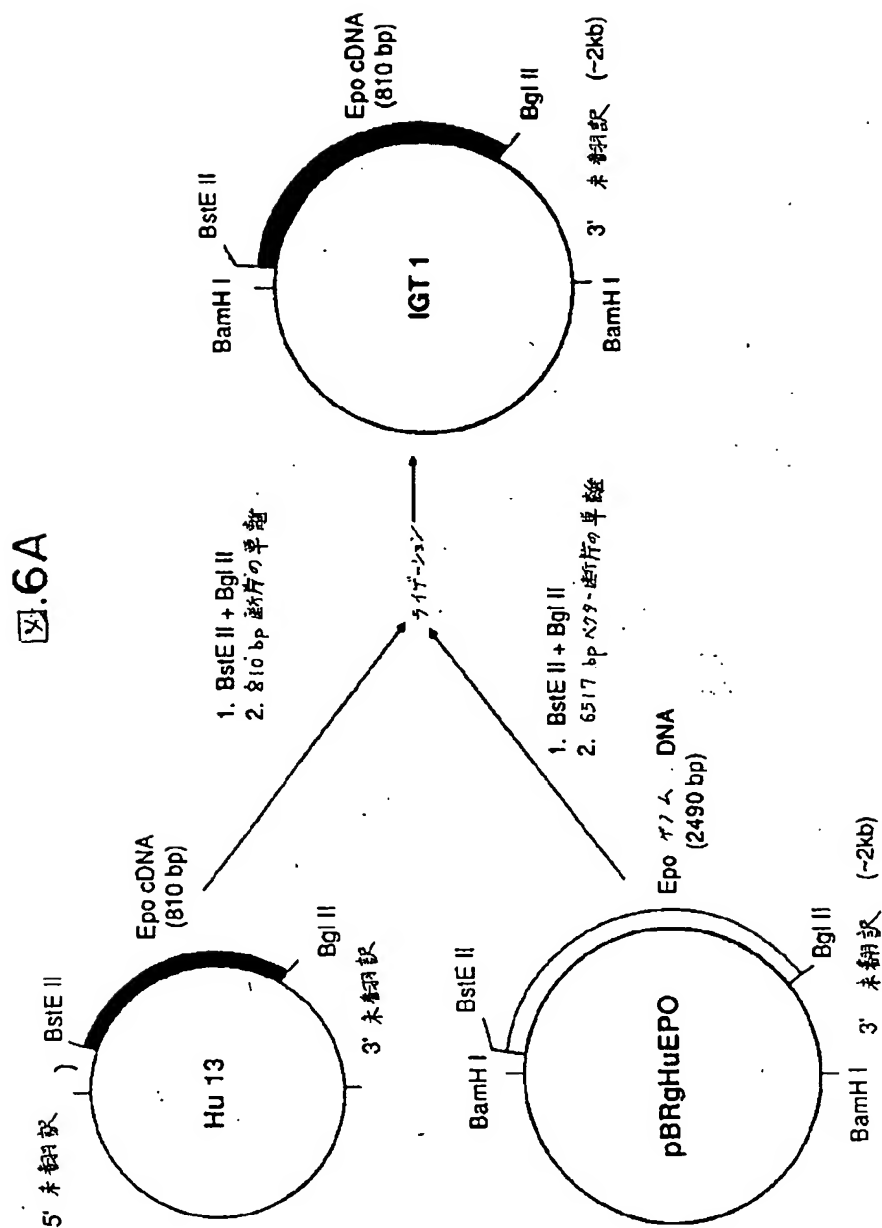
【図4】



5

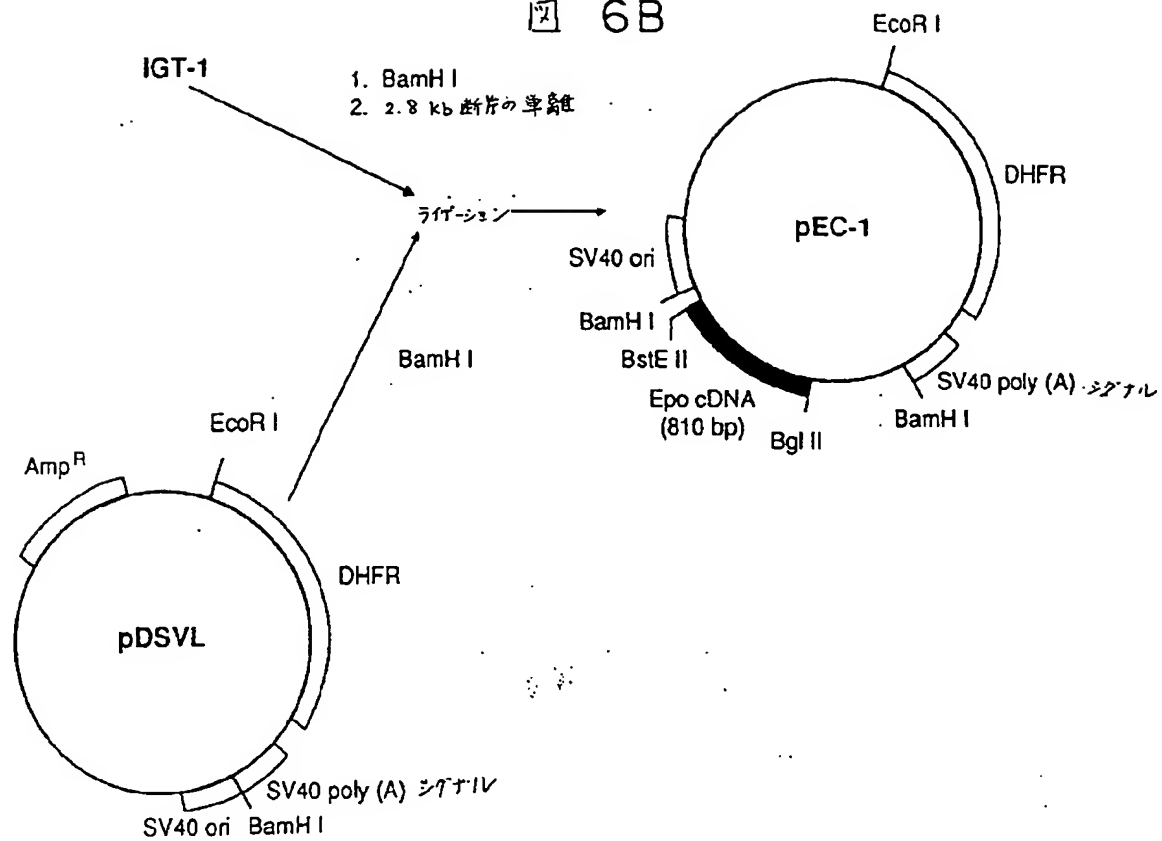


【図6A】



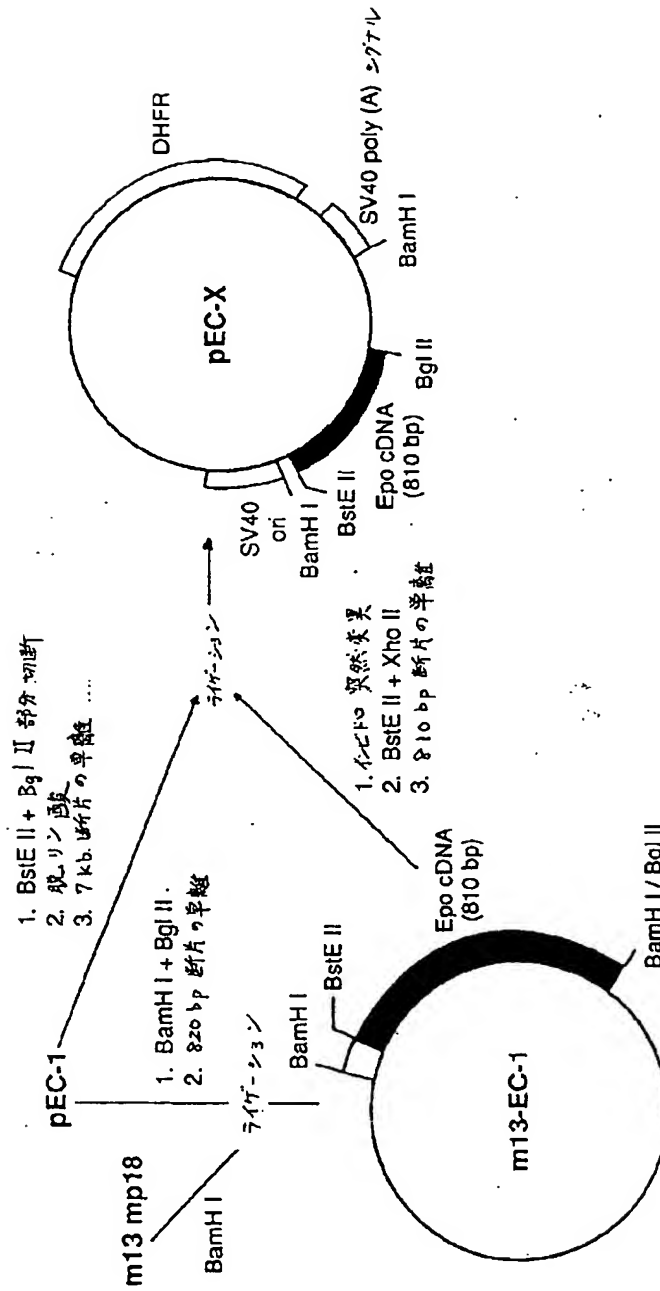
【図6B】

図 6B



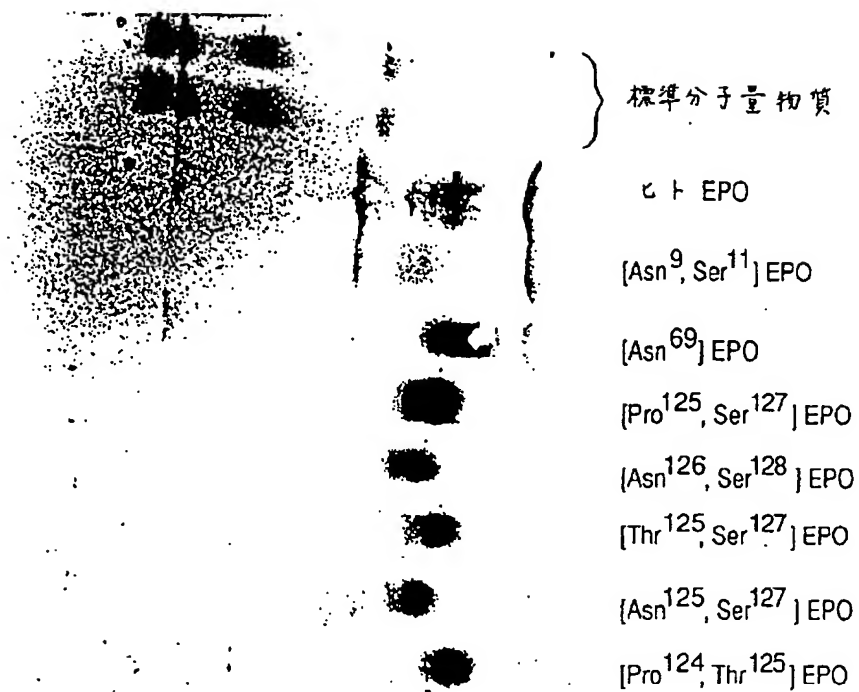
【図6C】

図 6C



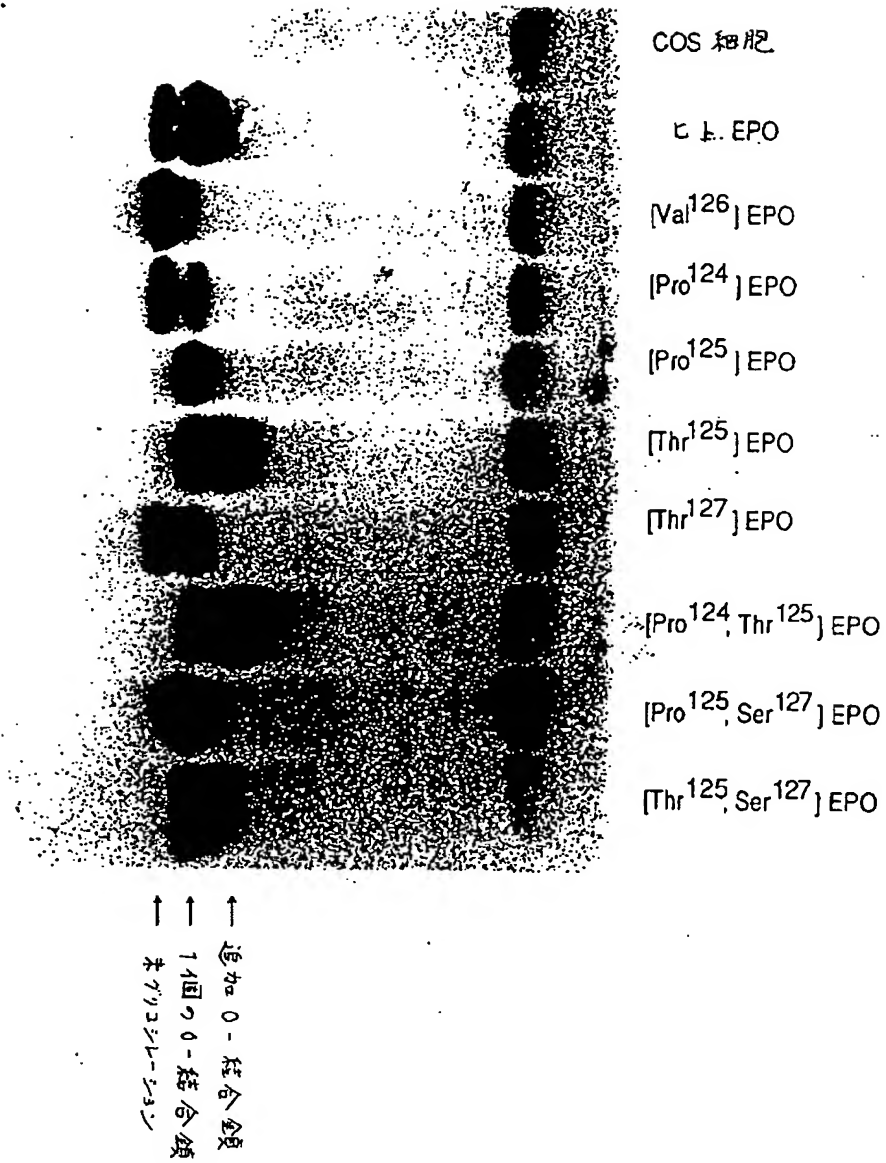
【図7】

図 7



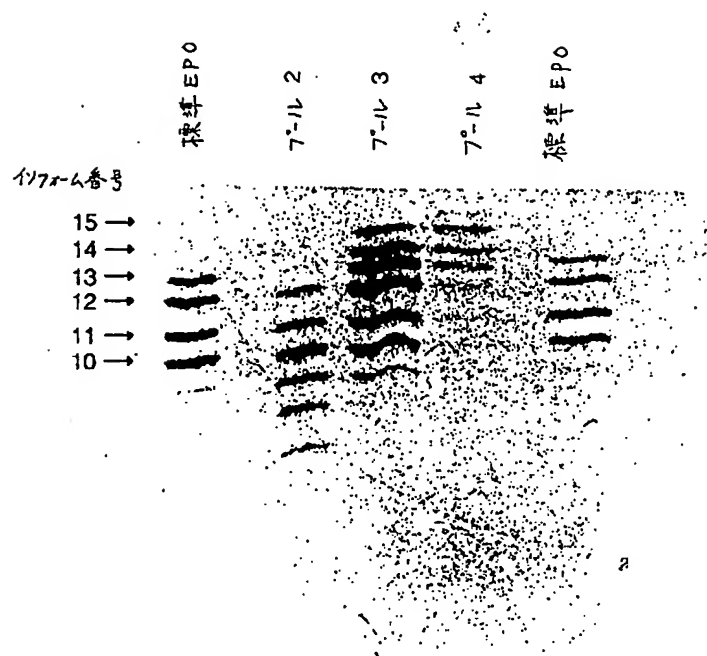
【図8】

図 8



【図9】

図 9



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/10				
15/09	Z N A			
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B		
/(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				
		9281-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
			(C 1 2 N 5/00	B
			C 1 2 R 1:91)	

(72)発明者 ステイーブン・ジョージ・エリオット
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、
 サウザンド・オークス、ゴールデン・クレ
 スト・アベニュー・1040

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.